

云南大理烟区烟叶内生真菌多样性及分布特征

李文君^{1Δ} 钱正强^{1Δ} 金蕊¹ 徐发华² 朱凯² 杨明挚^{1*} 陈穗云^{1*}

(1. 云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091)

(2. 云南省烟草公司大理州公司 云南 大理 671000)

摘要: 【目的】研究大理烟区烟叶内生真菌的多样性及分布特征。【方法】通过形态特征和 ITS-rDNA 序列分析对获得的菌株进行分类。【结果】从烟草叶片中共分离得到内生真菌 1 568 株, 分别归于 31 个属, 在属水平上的优势菌群为链格孢属(*Alternaria*)和镰孢属(*Fusarium*), 分别占真菌总数的 40.79%和 18.73%。【结论】烟草内生真菌的数量、种类、多样性和分布分别在不同部位叶片间和不同地区间存在差异, 在下部叶数量较多, 而上部叶的种类较多, 多样性更丰富。随着烟草的发育成熟, 内生真菌数量、种类和多样性增加, 在现蕾期和成熟期最大。

关键词: 烟草, 内生真菌, 分离, 鉴定, 分布特征

Diversity and distribution characteristics of endophytic fungi in *Nicotiana tabacum* in Dali District, Yunnan Province

LI Wen-Jun^{1Δ} QIAN Zheng-Qiang^{1Δ} JIN Rui¹ XU Fa-Hua² ZHU Kai²
YANG Ming-Zhi^{1*} CHEN Sui-Yun^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Dali Branch of Yunnan Tobacco Company, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: [Objective] Researched the diversity and distribution characteristics of endophytic fungi in *Nicotiana tabacum* in Dali District. [Methods] These strains were identified into gen-

基金项目: 国家烟草总局科技重大专项项目(No. 110200902033)

*通讯作者: Tel: 86-871-5031491

✉: 杨明挚: mzh-yang@163.com; 陈穗云: chensuiyun97@yahoo.com.cn

Δ并列第一作者

收稿日期: 2012-06-22; 接受日期: 2012-12-10

era based on morphological characteristics combined with ITS-rDNA gene sequences. [Results] A total of 1 586 strains of endophytic fungi were isolated from the leaves of *Nicotiana tabacum* and were identified into 31 genera. *Alternaria* and *Fusarium* are dominant fungal endophytes, occupying 40.79% and 18.73%, of total isolated strains respectively. [Conclusion] The quantity, diversity and distribution of the endophytic fungi were varied from different part leaves and different districts of *N. tabacum*. Larger quantity of endophytic fungi was found in lower part leaves than that of the upper ones. Otherwise, richer diversities of endophytic fungi were found in upper leaves. Along with the development of *N. tabacum*, the richness and diversity of endophytic fungi in *N. tabacum* leaves were increased and reached the largest during the squaring stage and maturity stage.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, Endophytic fungi, Isolation, Identification, Distribution characteristics

植物内生菌是指那些在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害症状的微生物。内生菌广泛分布于各种植物中,包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌。目前全世界至少已在 80 个属 290 多种禾本科植物中发现内生真菌^[1-3],内生真菌与植物在长期进化过程中,形成一种共生或互生的关系,在植物的生长发育和系统演化过程中起重要作用^[4]。感染内生真菌的植物往往具有生长快、耐受性强和抗病虫害等优势^[5],同时内生真菌还能增加宿主植物次生代谢的生成量^[6]。1993 年 Strobel 从短叶紫杉(*Taxus brevifolia*)分离到一株内生真菌,它能产生与宿主植物相同的肿瘤治疗剂紫杉醇^[7],此后植物内生真菌逐渐成为生物学研究的一个热点,其研究成果对生物防治、农业生产、医药开发和工业发酵都具有重要意义。

烟草(*Nicotiana tabacum*)为茄科(Solanaceae)一年生草本植物,是我国重要的叶用经济作物,种植面积和总产量居世界第一位,我国烟叶生产从数量上已经能够满足卷烟工业的需求。但由于种植地区和烟草品种的差异,使得烟叶内在品质,尤其是香气质量方面存在较大差别,与国外优质烟叶相比也存在较大的差距,因此如何提高

烟叶品质和实现我国烟草产业提出的科技兴烟,提高烤烟质量的目标,已成为烟草产业一个重要的发展方向。有研究表明烟草内生真菌种类较多,是宝贵的微生物资源库^[8-11]。烟草内生真菌不仅能促进烟草生长^[12],还能增强抗病虫害能力^[13]和降低烟草亚硝酸胺改善烟叶品质^[14]等作用,但烟草内生真菌相对其它植物内生菌的研究及应用来说开发利用较少,因此烟草内生真菌的研究及开发对整个烟草产业具有积极意义。大理州地处低纬度高原,地形地貌复杂,立体气候明显,全年气温变化平稳、光照充足和雨量集中适宜烟草的种植,是云南省的主要烟草产区。因此本研究拟对大理主要烟草产区的烟叶内生真菌分离和鉴定,探明烟叶内生真菌的种类和组成的多样性,掌握内生真菌在不同植株部位、不同地区和不同生长发育时期的分布特征,为进一步发掘具有应用潜力的烟叶内生真菌资源和提高烟叶品质的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 烟叶材料

本研究的烟草品种为红花大金元,于2010年6月至9月间采自云南省大理州的巍山县、南涧

县、弥渡县、云龙县和宾川县 5 个县。采用随机采样的方式采集有代表性的健康烟株的团棵期、旺长期、现蕾期和成熟期的第 4 片叶(下部叶)和第 10 片叶(上部叶)两个部位叶片。每个样点每次采集相同部位叶片 3 个合并放入一个灭菌的牛皮纸袋内封口标记, 放置于实验室 4 °C 冰箱保鲜, 48 h 内进行处理。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 水 1 000 mL, pH 自然。 1×10^5 Pa 灭菌 25 min, 临用时每升培养基中加 100 mg/L 的链霉素以抑制细菌生长。

1.3 内生真菌的分离、纯化与保存

用灭菌的剪刀将同一部位的 3 个烟叶剪成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 混合后置于灭菌烧杯中, 用 75% 酒精消毒 1 min, 无菌水洗 3 次; 再用 0.1% 升汞消毒 30 s, 无菌水洗 3-4 次。选取规则的叶片分别贴于 PDA 培养基上, 每皿贴 10 片叶片, 每份样品 5 个重复, 28 °C 培养。对照组取最后一次洗液 200 μ L 涂布于 PDA 培养基上, 倒置 28 °C 培养两周不长出菌落则证明灭菌彻底。挑取典型菌株菌落边缘菌丝尖端培养, 直至得到菌株的纯培养, 单菌落斜面保存。

1.4 内生真菌菌株鉴定

采用形态学和分子生物学相结合的方法进行内生真菌菌株的鉴定, 按真菌词典^[15]进行归类。形态学方法主要观察真菌菌落、孢子和菌丝的形态特征, 进行形态学归类, 在相同形态类型中选取 1 个代表的内生真菌菌株采用 CTAB 法^[16]提取基因组 DNA, 进行 ITS-rDNA 基因扩增。

引物序列为: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')。50 μ L 体系: 36.5 μ L dd H₂O、5 μ L MgCl₂ (1.5 mmol/L)、5 μ L 10×PCR Buffer、0.25 μ L dNTPs (10 mmol/L)、1 μ L 引物

1 (12.5 μ mol/L)、1 μ L 引物 2 (12.5 μ mol/L)、0.25 μ L Taq 酶、1 μ L DNA 模板。扩增程序: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 33 个循环; 72 °C 3 min; 4 °C 保存, 扩增成功后送至上海生物工程公司测序。测序结果通过 Chromas 软件校对, GenBank 中进行 BLAST 序列比对。

1.5 统计分析方法

采用单位面积丰富度反映烟叶中内生真菌菌株数量在单位面积叶片中的多少。采用 Berger-parker (1974) 优势度指数 (D : $D_i=N_i/N$) 表示一个种(属)在群落中的地位与作用。采用 Shannon-Wiener (1949) 多样性指数 [$H'=-\sum P_i \ln(P_i)$], 其中 $P_i=N_i/N$ 反映种群丰富度和均匀度, 其中 N 为群落内各属(或种)级真菌菌株的数量之和; N_i 为群落中属(或种)级真菌 i 的数量; P_i 为属(或种)级真菌 i 数量占群落个体总量的比例。采用 Jaccard 指数^[17] [$C_j=j/(a+b-j)$] 和 Sorenson 指数^[18] [$C_s=2j/(a+b)$] 计算各样地间内生真菌菌群的相似性系数, 其中 a 为样地 A 的种属数, b 为样地 B 的种属数, j 为样地 A 和 B 的共有种属数。

2 结果与分析

2.1 内生真菌组成

从云南大理州的 5 个县采集到烟叶样品 126 份, 分离获得内生真菌共 1 568 株, 通过形态学观察初步归类为 361 个类型, 提取真菌基因组 DNA 共 361 份, 经 ITS-rDNA 基因扩增和序列比对后鉴定为 31 个属。其中担子菌门 4 个属, 占真菌总数的 0.96%, 子囊菌门 27 个属占真菌总数的 97.89%, 少数因序列比对同源性低于 98% 而未鉴定出属种, 占真菌总数的 1.15%。依据庞雄飞等^[19]的研究, 某物种占整体物种的百分比 $\geq 10\%$ 为优势属(种), 1%-10% 为常见属(种), 百分比 $\leq 1\%$ 为稀有属(种)。大理州烟草叶片内生真菌优势种群为 *Alternaria* 和 *Fusarium*, 分别占真菌总数

的 40.79% 和 18.73%; 常见属 9 个, 占真菌总数的 34.05%; 稀有属 20 个, 占真菌总数的 4.35% (表 1)。其中 *Alternaria*、*Fusarium*、*Xylaria*、

Chaetomium、*Phoma*、*Nigrospora* 共 6 个属在烟草生长发育的各时期均出现, 为烟草生长发育密切相关的内生菌群。

表 1 烟叶内生真菌的类群组成
Table 1 The composition of endophytic fungi in leaves of *N. tabacum*

门 Phylum	目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数 Strains quantity	优势度 Dominance (%)		
担子菌门 Basidiomycota	多孔菌目	多孔菌科	栓菌属(<i>Trametes</i>)	1	0.06		
	木耳目	木耳科	木耳属(<i>Auricularia</i>)	1	0.06		
	伞菌目	伞菌科	鬼伞属(<i>Coprinus</i>)	11	0.69		
	非褶菌目	伏革菌科	原毛平革菌属(<i>Phanerochaete</i>)	3	0.19		
子囊菌门 Ascomycota	柔膜菌目	皮生菌科	软盘菌属(<i>Mollisia</i>)	2	0.13		
	盘菌目	盘菌科	光黑壳属(<i>Preussia</i>)	18	1.13		
	炭角菌目	炭角菌科	炭角菌属(<i>Xylaria</i>)	136	8.58		
			炭团菌属(<i>Hypoxyton</i>)	3	0.19		
			尾柄孢壳属(<i>Cercophora</i>)	21	1.32		
			炭皮菌属(<i>Biscogniauxia</i>)	1	0.06		
			<i>Astrocystis</i> 属	4	0.25		
			黑盘孢科	拟盘多毛孢属(<i>Pestalotiopsis</i>)	5	0.32	
			毛壳菌科	毛壳菌属(<i>Chaetomium</i>)	98	6.18	
				棒囊壳属(<i>Corynascus</i>)	2	0.13	
				梭孢壳属(<i>Thielavia</i>)	6	0.38	
				柄孢壳属(<i>Podospora</i>)	2	0.13	
			小丛壳科	炭疽菌属(<i>Colletotrichum</i>)	102	6.43	
			散囊菌目	发菌科	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	2	0.13
			假毛球壳目		黑孢属(<i>Nigrospora</i>)	62	3.91
	肉座菌目	丛赤壳科	镰孢属(<i>Fusarium</i>)	297	18.94		
			短梗霉属(<i>Aureobasidium</i>)	1	0.06		
	球腔菌目	球腔菌科	枝孢属(<i>Cladosporium</i>)	21	1.32		
			茎点霉属(<i>Phoma</i>)	42	2.65		
	格孢腔菌目		黑团孢属(<i>Periconia</i>)	2	0.13		
			亚隔孢壳属(<i>Didymella</i>)	14	0.88		
			格孢菌科	链格孢属(<i>Alternaria</i>)	647	41.26	
	坐囊菌目	葡萄座腔菌科	附球菌(<i>Epicoccum</i>)	1	0.06		
			<i>Edenia</i> 属	1	0.06		
			葡萄座腔菌属 (<i>Botryosphaeria</i>)	3	0.19		
			叶点霉属(<i>Phyllosticta</i>)	1	0.06		
	间坐壳目	黑腐皮壳菌科	拟茎点霉属(<i>Phomopsis</i>)	40	2.52		
未知菌 Unknown				18	1.15		

2.2 内生真菌在不同部位烟叶的分布

分离获得的 1 568 株内生真菌中, 上部叶有 727 株, 分属于 26 个属, 下部叶有 841 株, 分属于 21 个属。上部叶的单位面积丰富度为 0.92 个/cm² 低于下部叶的 1.07 个/cm², 多样性指数为 2.07 要高于下部叶的 1.96。上下部叶的优势属均为 *Alternaria* 和 *Fusarium*, 但上部叶中 *Alternaria* 的优势度 36.04% 低于下部叶的 45.66%, 而 *Fusarium* 的优势度 23.52% 要高于下部叶的 14.39% (表 2)。烟草下部叶中内生真菌数量较多, 主要优势菌的分布比例较高, 但上部叶中内生真菌的种类更多, 多样性更丰富, 特有菌更多。烟草内生真菌在不同部位烟叶的分布存在差异, 特有菌的分布体现出一定的专一性。

2.3 内生真菌在烟草不同生育时期的分布

在烟草的 4 个主要生育时期, 内生真菌单位面积丰富度和多样性指数随烟草的生长而升高, 在成熟期达到最大。内生真菌种类和组成随着烟草的生长发育逐渐增多, 在现蕾期最多。*Alternaria* 在 4 个生育时期均为优势菌, 而 *Chaetomium* 只在团棵期为优势菌, *Xylaria* 和 *Colletotrichum* 只在成熟期为优势菌, 成熟期优势菌有 3 个多于其他 3 个时期。在团棵期没有特有菌的分布, 但随着烟草的生长, 各时期特有菌属种数也逐渐增多, 现蕾期最多, 其次是成熟期 (表 3)。可以认为烟草内生真菌的数量、种类、多样性和优势菌的分布在不同发育时期存在差异, 但仍然具有一定的规律性。

表 2 内生真菌在不同部位烟叶的分布

Table 2 Distribution of endophytic fungi in different part of *N. tabacum*

部位 Parts	菌株数 Strains quantity	单位面积丰富度 (株/cm ²) Richness per unit area (strain/cm ²)	多样性 指数 Diversity index	真菌属 Genus	优势菌 Dominant endophytic fungi	特有菌 Unique endophytic fungi
上部叶 Upper leaves	727	0.92	2.07	26	<i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i>	<i>Phyllosticta</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Corynascus</i> , <i>Mollisia</i> , <i>Trametes</i> , <i>Edeuia</i> , <i>Astrocystis</i>
下部叶 Lower leaves	841	1.07	1.96	21	<i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i>	<i>Aureobasidium</i> , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Didymella</i>

表 3 内生真菌在烟草不同生育时期的分布

Table 3 Distribution of folia endophytic fungi from different growth stages of *N. tabacum*

生育时期 Growth stages	单位面积丰富度 (个/cm ²) Richness per unit area (strains/cm ²)	多样性指数 Diversity index	真菌属 Genus	优势菌 Dominant endophytic fungi	特有菌 Unique endophytic fungi
团棵期 Rosette stage	0.36	1.31	11	<i>Alternaria</i> , <i>Chaetomium</i>	
旺长期 Vigorous stage	1.08	1.76	18	<i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i>	<i>Podospora</i> , <i>Trametes</i>
现蕾期 Squaring stage	1.23	1.77	22	<i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i>	<i>Aureobasidium</i> , <i>Perico-</i> <i>nia</i> , <i>Astrocystis</i> , <i>Mollisia</i> , <i>Botryosphaeria</i>
成熟期 Mature stage	1.25	1.90	16	<i>Alternaria</i> , <i>Xylaria</i> , <i>Colletotrichum</i>	<i>Phyllosticta</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Edeuia</i>

2.4 内生真菌在不同地区的分布

弥渡县的单位面积丰富度最高为 1.56 个/cm², 云龙县的多样性指数最高为 2.00, 内生真菌种类最多为 18 个属, 虽然弥渡县的单位面积丰富度最高, 但云龙县的多样性指数最高, 内生真菌种类最多。*Alternaria* 在除云龙县外的 4 个地区均为优势菌, 而 *Chaetomium* 只在巍山县和云龙县为优势菌, *Xylaria* 和 *Colletotrichum* 只在云龙县是优势菌, *Fusarium* 只在南涧县是优势菌。各个县特有菌的种类分布并不完全相同, 云龙县的特有菌种类最多共有 5 个属(表 4)。可见烟草内生真菌的数量、种类和多样性在不同地区存在差异, 优势菌中 *Alternaria* 的分布较广泛, 但其优势性在不同地区不同。

2.5 内生真菌菌群相似性系数

通过两种相似性系数计算结果的比较, 发现

从烟草不同部位叶片分离得到的内生真菌菌群的 Jaccard 指数和 Sorenson 指数分别为 0.633 和 0.776。在不同生育时期, 内生真菌菌群之间的相似性系数各不相同, 旺长期与现蕾期的内生真菌菌群之间的相似性系数最高, Jaccard 指数和 Sorenson 指数分别为 0.538 和 0.700 (表 5)。在不同采样地区, 宾川与弥渡的内生真菌菌群之间的相似性系数最低, 而宾川与巍山、弥渡与南涧的内生真菌菌群之间的相似性系数最高(表 6)。表明烟叶内生真菌菌群在烟草中的分布存在一定的相似性, 但会因烟叶生长部位、烟草生育时期和种植地区的不同而存在差异。

3 讨论

本研究从健康烟叶组织分离得到的所有真菌菌群, 在烟叶材料表面消毒彻底的前提下, 认为

表 4 内生真菌在不同地区烟叶的分布
Table 4 Distribution of folia endophytic fungi from different regions of *N. tabacum*

地区 Regions	单位面积丰富度 (株/cm ²) Richness per unit area (strain/cm ²)	多样性指数 Diversity index	真菌属 Genus	优势菌 Dominant endophytic fungi	特有菌 Unique endophytic fungi
巍山 Weishan	0.97	1.33	12	<i>Alternaria, Chaetomium</i>	<i>Phyllosticta</i>
宾川 Binchuan	0.75	1.63	16	<i>Alternaria</i>	<i>Podospora, Trametes</i>
云龙 Yunlong	1.19	2.00	18	<i>Xylaria, Chaetomium Colletotrichum</i>	<i>Pestalotiopsis, Mollisia Epicoccum, Astrocytiss Aureobasidium</i>
弥渡 Midu	1.56	1.03	11	<i>Alternaria</i>	
南涧 Nanjian	1.37	1.68	17	<i>Alternaria, Fusarium</i>	<i>Periconia, Didymella, Edeuia</i>

表 5 烟叶内生真菌在不同生育时期的相似性系数
Table 5 Similarity coefficients of endophytic fungi in leaves of *N. tabacum* from different growth stages

生育时期 Growth stages	团棵期 Rosette stage	旺长期 Vigorous stage	现蕾期 Squaring stage	成熟期 Mature stage
团棵期 Rosette stage		0.261	0.375	0.421
旺长期 Vigorous stage	0.414		0.538	0.478
现蕾期 Squaring stage	0.545	0.700		0.407
成熟期 Mature stage	0.593	0.647	0.579	

注: 表中对角线以上为 Jaccard 指数, 以下为 Sorenson 指数。

Note: Jaccard index (above diagonal) and sorenson index (below diagonal).

表 6 烟叶内生真菌在不同地区的相似性系数
Table 6 Similarity coefficients of endophytic fungi in leaves of *N. tabacum* from different regions

地区 Regions	巍山 Weishan	宾川 Binchuan	云龙 Yunlong	弥渡 Midu	南涧 Nanjian
巍山 Weishan		0.474	0.364	0.438	0.450
宾川 Binchuan	0.643		0.360	0.286	0.435
云龙 Yunlong	0.533	0.529		0.450	0.400
弥渡 Midu	0.609	0.444	0.621		0.474
南涧 Nanjian	0.621	0.606	0.571	0.643	

注: 表中对角线以上为 Jaccard 指数, 以下为 Sorenson 指数.

Note: Jaccard index (above diagonal) and sorenson index (below diagonal).

这些真菌在烟叶组织内符合 Petrini 等对植物内生真菌的有关定义^[20], 因而可以把这些真菌类群作为烟叶内生真菌研究。在研究过的植物中均分离获得内生真菌, 从不同植物体内分离得到的内生真菌种类和数量不相同, 少则十几种, 多则近百种, 可以推断内生真菌在植物体内是普遍存在的^[21]。同样在烟草中内生真菌也是普遍存在的, Welty 等^[8]对未烘烤的烟叶内生真菌进行分离鉴定, 所有菌株归于 21 个属, 其中 *Alternaria*、*Cladosporium*、*Epicoccum*、*Trichoderma* 和 *Nigrospora* 等 5 个属占菌株总数的 89.5%。Harvey 等^[9]对健康烟叶的内生真菌进行分离及鉴定, 所有菌株归于 13 个属, 其中 *Alternaria* 和 *Penicillium* 为优势属。裴洲洋等^[10]从烟草的根、茎、叶中共分离得到 619 株内生真菌, 鉴定为 12 个属, 其中 *Alternaria* 和 *Chaetomium* Kunze 为优势菌群。韩伟^[11]对云南烟叶内生真菌的情况进行了详细的研究, 共获得 186 株烟叶内生真菌, 鉴定出 10 个种, 其中 *Alternaria citri* 为优势种, 并存在于烟草的整个生长季, 是烟叶内生真菌的地理遍在种。本研究分离得到的烟叶内生真菌种类多达 31 个属, *Alternaria* 和 *Fusarium* 是优势菌群, 其中的一些内生真菌伴随烟草生长发育的 4 个主要时期, 可能是烟叶内生真菌的常住菌群, 可见大理州主要烟草产区的烟叶内生真菌种类较多,

多样性较高, 内生真菌资源较丰富。

烤烟叶片自下而上可大至分为下部叶、中部叶和上部叶, 在整个生长时期下部叶的生长时间要比上部叶长, 因此下部叶被真菌浸染的机会更大, 同时优势菌群建立的时间也更长。随着生长时间的推移, 一些生存能力较弱的真菌菌群的营养和生存空间被生存能力较强的优势菌群所占有, 使优势菌群大量繁殖, 而其它菌群的分布减少或消失, 造成了下部叶中内生真菌菌群的数量较多, 但多样性、种类和特有菌的种类要少于上部叶。随着烟株的生长发育, 根系和烟叶的不断生长及新叶的出现, 烟株的水分和矿质元素的吸收能力增强, 叶片数量及表面积增加促进烟株的光合作用制造的营养物质增多, 同时烟叶生理状况及表皮结构发生变化, 使烟叶表面真菌更容易侵入叶片组织中, 并在烟叶内大量繁殖或定殖。Fisher 等^[22]认为随着植物年龄的增加, 较年轻龄的植株有更多机会被真菌反复侵染, 同时植株生理状况和表皮结构发生改变, 使真菌更容易侵入植物组织内, 致使内生真菌的种类和丰富度随之增加。

Petrini 等认为内生真菌类群会受到环境因子的影响, 如采集地的湿度、季节变化、海拔和周围植被类群等。Fisher 等^[23]发现 *Quercus ilex* L. 叶子上的内生真菌类群在英格兰、马略卡岛和瑞士

三地明显不同, Southcott 等(1997)^[24]、Guo 等(2000)^[25]研究认为蒲葵 *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. 叶子上内生真菌类群在香港和百慕大两地也明显不同。大理烟草主产区地形地貌复杂, 海拔高差悬殊, 气候的垂直差异显著, 雨量集中, 全年光照充足适宜烟草种植。本研究选取的 5 个样地间海拔、地势、土壤状况和周围植被等自然条件存在差异, 同时因为自然因素和人为因素致使各地区灌溉情况不一致, 造成了水分和营养物质在各地间的差异, 这些因素也可能引起这些地区烟草内生真菌的数量、种类和多样性的差异。

植物内生真菌对促进植物生长和增强植物抗逆性方面有显著作用, 宋文玲等^[26]研究发现内生真菌 *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr1 菌株能提高菊花的产量、有效成分总黄酮和挥发油的含量。Freeman 和 Rodriguez^[27]发现 *Colletotrichu* 的一个突变株(*C. magnapath-1*)可以激活宿主的防御系统, 使之免受炭疽菌和镰刀菌等病原菌的侵害。伊艳杰等^[28]发现镰孢霉属(*Fusarium* sp.)和曲霉属(*Aspergillus* sp.)真菌能增强小麦的白粉病抗性, 此外植物内生真菌还能和植物相互作用产生各种各样具有巨大应用潜力的次生代谢产物。在烟草产业中, 微生物可以提高烟草致香物质的含量, 降低烟草有害成分和烟碱含量, 达到改善烟叶品质的目的。Seaeich 等(1999)报道了在卷烟前 6 天喷洒链格孢(*Alternaria*)的孢子悬浮液可大大提高卷烟香气。本研究得到的大量烟叶内生真菌, 进一步揭示了烟草组织存在着丰富的微生物资源, 可以为今后提高烟草产量、改善烟叶品质和烟草病虫害的生物防治提供基础。

参 考 文 献

- [1] Bary A. Morphologie and physiologie der pilze flechten and myxomyceten[M]. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1866, 311-316.
- [2] Carroll GC. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1988, 69(1): 2-9.
- [3] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of the Leaves (Ed. by J Andrews & S S Hirano)[M]. New York: Springer Verlag, 1991: 179-197.
- [4] Ahlholm JU, Helander M, Henriksson J, et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha* a fungal endophyte of birch trees[J]. Evolution, 2002, 56(8): 1566-1573.
- [5] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754.
- [6] Mucciarelli M, Camusso W, Maffei M, et al. Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(4): 685-696.
- [7] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 146-147.
- [8] Welty RE, Lucas GB, Fletcher JT, et al. Fungi isolated from tobacco leaves and brown-spot lesions before and after flue-curing[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(9): 1309-1313.
- [9] Harvey W, Spurr Jr, Welty RE. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp.[J]. Phytopathology, 1975, 65: 417-422.
- [10] 裴洲洋, 张猛. 烟草内生真菌分布特征研究[J]. 河南农业科学, 2009, 6: 97-99, 104.
- [11] 韩伟. 云南烟草内生真菌生物多样性初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2004.
- [12] 易龙, 马冠华, 肖崇刚. 烟草生防益菌对烟草幼苗的促生效应研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 331-333.
- [13] 王万能, 全学军, 韦云隆. 烟草内生细菌118菌株对烟草黑胫病的诱导抗性研究[J]. 中国烟草科学, 2004(1): 4-6.
- [14] 祝明亮, 李天飞, 汪安云. 白肋烟内生细菌的分

- 离鉴定及降低 N-亚硝酸胺含量研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 422-426.
- [15] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. Dictionary of the fungi 10th edition[M]. Trowbridge: Cromwell press, 2008.
- [16] 杨艳秋, 王丽, 贺丹, 等. 真菌 DNA 提取方法的建立和比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(50): 10093-10096.
- [17] Whittaker RH. Evolution of measurement of species diversity[J]. Taxon, 1972, 21(2/3): 213-251.
- [18] Patricia K, Kevin JG, Jack JL. Measuring beta diversity for presence-absence data[J]. Journal of Animal Ecology, 2003, 72(3): 367-382.
- [19] Pang XF, You MS. Beetle community ecology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1996: 1-147.
- [20] Petrini O, Sieber TN, Toti L, et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi[J]. Natural Toxins, 1992, 1(3): 185-196.
- [21] Sinclair JB, Cerkauskas. Latent infection vs endophytic colonization by fungi[A]// Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants[M]. Redlin SC, Carris LM, eds. St. Paul, Minnesota: APSS Press, 1996: 3-30.
- [22] Fisher PJ, Petrini O, Sutton BC. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England[J]. Sydowia, 1993, 45(2): 338-345.
- [23] Fisher PJ, Petrini O, Petrini LE, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Marjorca and Switzerland[J]. New phytologist, 1994, 127(1): 133-137.
- [24] Southcott KA, Johnson JA. Isolation of endophytes from two species of palm from Bermuda[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 789-792
- [25] Guo LD, Hyde KD, Liew EC. Detection and identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences[J]. New Phytologist, 2000, 147: 617-630.
- [26] 宋文玲, 戴传超, 刘晓珍, 等. 不同内生真菌对菊花产量和品质的影响[J]. 中药材, 2010, 33(1): 4-7.
- [27] Freeman S, Rodriguez RJ. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist[J]. Science, 1993, 260(5104): 75-78.
- [28] 伊艳杰, 张长付, 时玉, 等. 小麦白粉菌拮抗真菌的筛选、鉴定及生防效果[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 237-276.